

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number : 09-143090

(43) Date of publication of application : 03.06.1997

(51)Int.Cl. A61K 35/78
A61K 35/78
A61K 35/78
A61K 35/78
// C12N 9/99

(21)Application number : 07-326224

(71)Applicant : KYODO NYUGYO KK

(22) Date of filing : 22.11.1995

(72)Inventor : OISHI HIFUMI

TANI HISANORI
TAHAMA HIROTSUGU
KIRIHARA OSAMU

(54) ANTIALLERGIC MATERIAL

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain an antiallergic material derived from a hot water extract of *Crataegus cuneata* Sieb. et Zucc., having inhibiting action against hyaluronidase activity and cyclooxygenase activity, capable of inhibiting histamine release from mast cells, reducing activities of antigen presenting cells and inhibiting maturation of lymphocytes.

SOLUTION: This antiallergic material is obtained by extracting *Crataegus cuneata* Sieb. et Aucc. with hot water, e.g. by dipping seeds of *Crataegus cuneata* Sieb. et Auss. in 2-3 times volume of deionized water or 10% ethyl alcohol, heating at 90-95°C for 20 minutes after crushing, standing for at room temperature for 3 days agitating for a while, obtaining a supernatant by a filtration or a centrifugal separation, dialysing the supernatant through a dialysis membrane having 12000-14000 fractionation molecular weight against deionized water, collecting the inner dialysate and lyophilizing the inner dialysate.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than
the examiner's decision of rejection or
application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-143090

(43)公開日 平成9年(1997)6月3日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	府内整理番号	F I	技術表示箇所
A 61 K 35/78	AED		A 61 K 35/78	AEDH
	ABA			ABA
	ABF			ABF
	AEM			AEM
// C 12 N 9/99		C 12 N 9/99		
			審査請求 未請求 請求項の数 5 FD (全 6 頁)	

(21)出願番号 特願平7-326224

(71)出願人 000162412

協同乳業株式会社

東京都中央区日本橋小網町17番2号

(22)出願日 平成7年(1995)11月22日

(72)発明者 大石 一二三

東京都立川市西砂町3-15-24

(72)発明者 谷 久典

東京都福生市本町31-2-203

(72)発明者 田濱 弘繼

東京都福生市本町31-2-208

(72)発明者 桐原 修

東京都立川市柴崎町4-11-6-101

(74)代理人 弁理士 石山 博 (外1名)

(54)【発明の名称】 抗アレルギー性物質

(57)【要約】

【課題】 サンザシの热水抽出に由来する、抗アレルギー性物質の产生に関する。

【解決手段】 サンザシの热水抽出で得られる、ヒアルロンダーゼ活性又はシクロオキシゲナーゼ活性を阻害する抗アレルギー性物質を提案し、これにより、肥溝細胞からのヒスタミンの遊離を抑制し、又は抗原提示細胞の活性を低下させ、若しくはリンパ球の成熟を抑制する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 サンザシの熱水抽出で得られるヒアルロニダーゼ活性を阻害することを特徴とする抗アレルギー性物質。

【請求項2】 サンザシの熱水抽出で得られるシクロオキシゲナーゼ活性を阻害することを特徴とする抗アレルギー性物質。

【請求項3】 肥満細胞からのヒスタミンの遊離を抑制することを特徴とする請求項1又は2に記載の抗アレルギー性物質。

【請求項4】 抗原提示細胞の活性を低下させることを特徴とする請求項1又は2に記載の抗アレルギー性物質。

【請求項5】 リンパ球の成熟を抑制することを特徴とする請求項1又は2に記載の抗アレルギー性物質。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】この発明は、サンザシの熱水抽出に由来する、抗アレルギー性物質の产生に関する。

【0002】

【従来の技術】近年花粉症や特定の食品又はハウスダストなどに代表されるような、アレルギー性疾患や、アトピー性皮膚炎など、I型アレルギー患者が急速に増加している。そのためI型アレルギーに関して様々な検討がなされており、その発症過程は大まかに次の3段階によるとされている。すなわち①外来性の抗原に対して免疫グロブリンE(IgE)が産生され、肥満細胞や好塩基球に付着し感作が成立する。②抗原が感作細胞に接触し、ヒスタミンなどのケミカルメディエイターが遊離する。③遊離したケミカルメディエイターが血管透過性を亢進させたり、平滑筋を強く収縮させ、アレルギー症状を発現する。

【0003】したがつてこのタイプのアレルギー発現を抑制するには、①又は②の段階のいずれかを止めればよい。①に対しては肥満細胞や好塩基球膜表面のIgEレセプターをブロックする、種々のアンタゴニストが開発され、医薬品として既に発売されている。②に関してはヒスタミンなどのケミカルメディエイターの遊離に細胞内のプロテアーゼ(主にセリンプロテアーゼ)やヒアルロニダーゼが関与することから、これらの阻害物質が有効であると報告されている(Woodbury, R. G. et al., (1987) *Acta Histochem. Cytochem.*, 20:261-269, Katunuma, N and Kido, H. (1988) *J. Cell. Biochem.*, 38: 291-301, Fukuoka, Y. and Hugli, T.E. (1990) *J. Immunol.*, 145:1851-1858, Kawagoe, S. (1994) *Fragrance J.*, 8:81-86, 小泉真理子(1988) 東京女子医大学雑誌、58:1063-1071、掛川寿夫、他、(1984) 炎症、4:437-438、Kakegawa, H., et al. (1985) *Chem. Pharm. Bull.*, 33:642-646)。

【0004】しかし上記アレルギーは一般的にIgE依存

性のI型アレルギーとされているものの、実際には免疫グロブリンG(IgG)が関与するIII型アレルギーとの複合型が主体であるため、IgEレセプターアンタゴニストの効果はあまり期待できない。またプロテアーゼインヒビターの適用についても、生体で用いるには他の組織や細胞への傷害が多く、またそれ自体も抗原と成り得るなどの問題点を有している。さらにはヒスタミンの他に重要なケミカルメディエイターであるプロスタグランジン(PG)産性能には全く影響を及ぼさず、抗原に対する抗体産生を抑制する作用も認められないことから、根本的にアレルギー症状を改善する方法ではない。

【0005】古来、わが国では、紫蘇葉、枇杷葉、ドクダミやアロエなど、種々の植物に抗炎症性や抗アレルギー作用があると経験的に伝えられて来た。当初α-リノレン酸の作用であると考えられていたが、起炎物質の一種であるヒアルロニダーゼ(HAse)を阻害するヒアルロニダーゼインヒビター(HAI)の作用である(Kakegawa, H., et al. (1985) *Chem. Pharm. Bull.*, 33:642-646)ことが解明されはじめ、HAIを抗アレルギー物質として用いようとの試みが活発になり始めた(Kawagoe, S. (1994) *Fragrance J.*, 8:81-86、小泉真理子(1988)東京女子医大学雑誌、58:1063-1071)。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】HAIによるヒスタミン遊離抑制はある程度解明されてはいるものの、抗体産生抑制のメカニズムは不明のままであり、その解明が待たれている。さらには既知の植物由来HAIにはPG産生抑制の作用はなく、PG産生に関与しているシクロオキシゲナーゼのインヒビターを合わせ持つ、安全な物質の開発が待たれていた。そこで発明者らは、HAIとシクロオキシゲナーゼインヒビター活性を合わせ持つ植物体を広く検索し、古来、一般的に食に供されていたサンザシにそれらの作用があることを見出しこの発明を成し遂げた。

【0007】

【課題を解決するための手段】すなわちこの発明は、サンザシの熱水抽出で得られる、ヒアルロニダーゼ活性又はシクロオキシゲナーゼ活性を阻害する抗アレルギー性物質を提案し、これにより、肥満細胞からのヒスタミンの遊離を抑制し、又は抗原提示細胞の活性を低下させ、若しくはリンパ球の成熟を抑制しようとするものである。

【0008】

【発明の実施の形態】

サンザシエキスの調製：サンザシ種子(小林香料社製)を、2~3倍量の脱イオン水又は10%エチルアルコールに浸漬し、マスコロイダー(増子製作所社製)で粉碎した。これを90~95°C、20分間加熱し、時々攪拌しながら3日間室温に放置した。沪過又は遠心分離(5,000g×20分)によって上清液を得、分画分子量12,000~14,000の透析膜で脱イオン水に対して透析した。透析外液にはHA

I及びシクロオキシゲナーゼインヒビターのいずれの活性も認められないことから、透析内液を集め、凍結乾燥した。これをサンザシエキスとし、実験に用いた。

【0009】HAIとシクロオキシゲナーゼインヒビター活性の測定：HAI活性はTung, J.S.らの方法(Tung, J. S. et al., (1994) Anal. Biochem., 223: 149-152)に準じて測定した。シクロオキシゲナーゼインヒビター活性はOhki,Sら(Ohki,S. et al., (1979) J.Biol.Chem., 254:829)の方法に準じて行なつた。

【0010】ヒスタミン遊離抑制：ラットを放血致死後直ちに腹腔よりPBSを用いて細胞を採取した。洗浄後、 1.0×10^6 個/ 0.5ml になるように細胞を調整後、試験管に分注した。反応はすべて37°Cでそのほかは4°Cで行なつた。細胞を入れた試験管を10分間インキュベートし、抗原(0.5mg/ml)を $100\mu\text{l}$ 加え、さらに5分間反応させた。総ヒスタミン量は沸騰水浴中で5分間煮沸させた。その後遠心上清を集め、ヒスタミン量を蛍光法で測定した。すなわち、サンプルを $900\mu\text{l}$ 採り、4N水酸化ナトリウムを $90\mu\text{l}$ 、1%オルトフタルアルデヒド(100%メタノールに溶解)を $30\mu\text{l}$ 加えて攪拌し、4分間室温で反応させた。次に、3N塩酸を $110\mu\text{l}$ 加え反応を停止させ、励起波長360nm、蛍光波長450nmの蛍光強度を測定した。

【0011】抗原提示細胞の抗原提示能への影響：抗原提示細胞-T細胞相互作用の解析を行なうにはI-regulation associated(Ia)発現を検討することが非常に有用であるとされているので、マウス腹腔マクロファージを用いて検討した。一週間前からサンザシエキスを $1.4\text{mg/Kg} \cdot \text{体重濃度}$ 経口投与したマウス(BALB/C、5週令、♂)から、Listeria monocytogenes生菌 1×10^3 個を腹腔に投与して免疫する方法(野本亀久雄他、日本細菌学会教育委員会編、細菌学技術叢書)(1985)5:80-86、菜根出版社)に従って、腹腔マクロファージを得た。これを 1×10^3 個スライドチャンバー(ファルコン社製)に植え、10%FCS加 RPMI 1640培地で5%CO₂、37°Cの条件下で1時間培養した。一次抗体として抗Ia^kモノクロナル抗体(ベクトンデッキンソン社製)、2次抗体としてFITC-F(ab')₂抗マウスIgG(カペル社製)を用いて染色し、細胞100個当たりのIa抗原陽性細胞数を数えた。対象として、無処置(サンザシエキスを投与していない)のマウスから同様に処理して得たマクロファージのIa抗原陽性細胞数を同様に操作染色し、ブランクとして2次

抗体のみで反応させ、2次抗体陽性細胞数を差し引いた値をIa抗原陽性マクロファージとして数えた。

【0012】PG産生抑制：マウス(BALB/C 5週令、♂)にサンザシエキスを一週間 $1.4\text{mg/Kg} \cdot \text{体重経口投与し}$ 、腹腔に 1×10^6 個の加熱処理したCorynebacterium parvumを投与し、3日後の血漿PGE₂量をHunesらの方法(Hunes, J.L. et al. (1980) J. Immunol., 125:2110-2116)に準じて測定した。

【0013】IgEとIgG産生抑制：IgE産生抑制は一週間前からサンザシエキスを $1.4\text{mg/Kg} \cdot \text{体重経口投与したマウス(BALB/C 5週令、♂)}$ に感作物質としてオバルミンを用いる今岡らの方法(今岡浩一他、(1993)アレルギー、42:74-80)に準じて感作物質を腹腔内投与し、さらに一週間後同様に感作物質を投与した。この間サンザシエキスを同容量継続的に経口投与した。感作物質投与3週間後に尾静脈から採血し、血清中のIgE量をELISA法で測定した。IgG産生抑制はIgEと同様にサンザシエキスで処理したマウスにアジュバンド化したオバルミンを一週間間隔で2回筋肉内投与し、感作3週間後に尾静脈から血清を得、オバルミン特異的IgG量をELISA法で測定した。サンザシエキス処理をしていないものを対象とした。

【0014】T細胞への影響：IgG産生抑制に用いたマウス尾静脈からヘパリン加血液を得、CD4、CD8、CD45(いずれもベクトンデッキンソン社製)抗体で染色し、フローサイトメトリーで調べた。

【0015】PCA反応：ラットのIgEの力価はMotaの方法に従って行った(Mota, I., Immunology, 12, 343-348(1967))すなわち、抗血清サンプルを生理食塩水で倍数希釈し、あらかじめラットの毛を刈った背中に $100\mu\text{l}$ 皮内に注射した。3-4時間反応させた後、1mgのオバルミンを含む0.5%エバンスブルー溶液を1ml静脈内に注射した。30分後放血致死後、皮膚の裏側から判定した。力価は青いスポットのA.620nmの吸収で示した。

【0016】結果：HAIとシクロオキシゲナーゼインヒビター活性：HAI活性は3,953 units/mg · solidであり、シクロオキシゲナーゼインヒビターの阻害率は60%であつた。

【0017】ヒスタミン遊離抑制：サンザシエキスによる肥溝細胞からのヒスタミン遊離抑制率を表1に示す。

【0018】

【表1】

肥満細胞からのヒスタミン遊離抑制

サンザシエキス濃度(mg)	ヒスタミン遊離抑制率(%)
0.25	47.5
0.50	60.1
1.0	75.8

【0019】肥満細胞からのヒスタミン遊離抑制率はサンザシエキス濃度0.25mgで約50%、0.5mgで約60%、1mgで約76%であり、肥満細胞からのヒスタミンの遊離を高率に抑制していた。

【0020】抗原提示細胞の抗原提示能への影響：抗原提示細胞への影響

提示能の指標としてIa陽性細胞数をカウントし、表2にまとめた。

【0021】

【表2】

	Ia陽性細胞数	Ia陽性率(%)*
ブランク	3.7	3.7
サンザシエキス処理	10.5	10.5
コントロール	50.5	50.5

*：陽性率は全細胞(100個)当たりの割合で表示した。

【0022】コントロール(サンザシエキス無処理)のIa陽性率は50.5%であったが、サンザシエキスで処理することにより、その陽性率は約1/5に抑制された。データは示さないが、同様に得た細胞の貧飢能に変化を認めなかつたことから、これはサンザシエキスに抗原提示細胞活性化抑制作用や、抗原提示能抑制作用があることを

表わしている。

【0023】IgEとIgG産生抑制：T細胞への影響：尾静脈から得た血清中の抗原(オバルミン)に対する特異抗体(IgEとIgG)量を表3に示す。

【0024】

【表3】

	抗体産生量*	
	IgE	IgG
ブランク	ND	ND
コントロール	256(100)	80,000(100)**
サンザシエキス処理	32(12.5)	20,000(25.0)

*：抗体産生量は希釈倍数の逆数で表示した。

**：()内数字はコントロールに対する割合(%)である。

【0025】サンザシエキス処理によりオバルミンに対する特異抗体の産生能はIgE、IgG共に抑制されており、それらのコントロールに対するIgEとIgGの産生はそれぞれ87.2%、75%抑制されていた。

【0026】T細胞への影響：T細胞膜表面マーカーであるCD45、CD4、CD8陽性細胞率を表4に示す。

【0027】

【表4】

T細胞各マーカー陽性率

	細胞表面 マーカー		
	CD45	CD4	CD8
ブランク	100*	100	100
コントロール	67.3	108.8	110.1
サンザシエキス処理	206.7	80.7	85.0

*: 各マーカーの数字はブランク(100)に対する値である。

【0028】コントロールのCD4とCD8の割合はそれぞれ109と110であり、両者ともブランクに比してほぼ10%上昇していたが、サンザシエキスで処理すると、両者ともにその割合は15~20%、対コントロール比では23~26%も低下していた。これは抗原提示細胞の抗原提示能が抑制されていた(表2)ことから、それからの情報刺激が充分にT細胞に伝達されていないことに起因すると考えられる。またCD45陽性細胞の比率が対ブランク比で倍以上に上昇しており、逆にCD4、CD8陽性細胞が15~20%減少して

いるのは、サンザシエキスに含まれているHAIの作用により、HAse活性が阻害され、内因性HAが上昇し、リンパ球のホーミングレセプター(CD44)が飽和され、胸腺や各組織でのリンパ球の教育がある程度阻害された結果、T細胞の成熟がある程度抑制されていると考えられる。

【0029】プロスタグラジン産生抑制作用:サンザシエキスによるPGE₂産生抑制作用を表5に示す。

【0030】

【表5】

プロスタグラジンE₂産生抑制

	PGE2 (ng/ml)	産生率(%)*
ブランク	5.5	100
コントロール	10.8	196.4
サンザシエキス処理	7.1	129.1

*: 産生率(%)はブランクを100として算出した。

【0031】血漿PGE₂量は表5に示したように、コントロールではブランクに比して196.4%とほぼ倍に増加していたが、サンザシエキスで処理した場合の値は129.1であり、その増加率は約30%にしか過ぎず、産生抑制率は

約70%であった。

【0032】PCA反応: PCA反応の結果を表6に示す。

【0033】

【表6】

PCA反応抑制

	A. 620nm*	抑制率(%)**
ブランク	0.007	-
コントロール	0.534	100
サンザシエキス処理(0.5)***	0.214	59.9
サンザシエキス処理(1.00)	0.107	80.0

*: 皮膚染色部(エバンスブルー)の吸光度の値を表示した。

**: コントロールを100%として抑制率を算出した。

***: 各数字は投与量(ng/kg・体重)を表す。

【0034】PCA反応は受身感作された抗体が、組織中の肥満細胞上のレセプターに反応し、投与された抗原との反応により、ケミカルメディエイターが遊離され、血管透過性が亢進される現象である。この反応はIgE抗体が関与するI型アレルギーの試験に広く適用されている非常に一般的な方法である。表6に示したように、サンザシエキスで処理するとPCA反応抑制率(%)は0.5mg/Kgで60%、1mg/Kgで80%であり、非常に高い抑制率を示し

た。

【0035】

【発明の効果】この発明によれば、極めて簡略な方法によって得られるサンザシエキスにより、抗原提示細胞活性化抑制作用や、抗原提示能抑制作用が得られる抗アレルギー性物質を产生することが可能であり、その利用価値は顯著なものである。